

# 体外共表达的猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白可形成异源二聚体

马 艳<sup>1</sup> 江云波<sup>1</sup> 肖少波<sup>1,2</sup> 方六荣<sup>1,2\*</sup> 陈焕春<sup>1,2</sup>

(华中农业大学<sup>1</sup> 动物医学院动物病毒室<sup>2</sup> 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘 要:** 为了探讨猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) ORF5 基因编码的 GP5 蛋白和 ORF6 编码的 M 蛋白体外共表达特性, 分别构建了 PRRSV ORF5、ORF6 单基因或双基因共表达的真核表达质粒 pCI-ORF5、pCI-ORF6 和 pCI-ORF5/ORF6, 转染 BHK-21 细胞, Western blot 检测证实共表达的 GP5 和 M 蛋白能够形成异源二聚体。同时, 以绿色荧光蛋白 (EGFP) 和红色荧光蛋白 (RFP) 为示踪, 发现当 ORF5-EGFP 和 ORF6-RFP 共表达时, 能促进 GP5 蛋白从内质网向高尔基体转运, 提示 GP5-M 异源二聚体的形成可能与 GP5 蛋白的翻译后修饰、转运、定位有关。

**关键词:** PRRSV, ORF5, ORF6, 双基因共表达, 异源二聚体

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2006)04-0639-06

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种严重危害养猪业的新传染病<sup>[1]</sup>。临床上以妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征。最初由于不知其病原被称为“神秘病”。该病自 1987 年首次在美国发现以来, 随后加拿大和欧洲一些国家也相继报道了该病的发生, 几年之内便席卷了北美洲和欧洲大陆, 现已蔓延至许多亚太国家和地区<sup>[2]</sup>。尽管我国 1995 年才首次暴发此病, 但根据临床和血清学调查, 该病在我国普遍存在, 而且近年来还呈流行态势<sup>[3]</sup>。

PRRSV 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 与马动脉炎病毒 (EAV)、鼠乳酸脱氢酶病毒 (LDV) 和猴出血热病毒 (SHFV) 同属动脉炎病毒科<sup>[4]</sup>, 基因组大小为 15kb, 包括 9 个开放阅读框架 (ORFs)。其中, ORF1 (包括 ORF1a 和 ORF1b) 编码病毒的复制酶, ORFs 2~4 分别编码病毒的 GP2a、GP2b、GP3、GP4 4 种次要结构蛋白, ORFs 5~7 编码 3 种主要结构蛋白 GP5、M 和 N。GP5 为囊膜糖蛋白, 也是一种多功能蛋白, 参与细胞免疫与体液免疫, 尤其是中和抗体的产生, 是发展新型疫苗的良好靶抗原。M 蛋白是非糖基化膜蛋白, 在介导病毒的吸附和诱导细胞免疫中具有重要作用。N 蛋白则是一种高度保守的核衣壳蛋白, 具有很强的免疫原性, 但针对 N 蛋白的抗

体不具有中和病毒的能力<sup>[5,6]</sup>。随着对 PRRSV 分子生物学研究的深入, 目前已证实 PRRSV 的 GP5 和 M 在病毒感染的细胞中形成以二硫键连接的异源二聚体 GP5-M, 但对其确切的功能尚不清楚<sup>[7]</sup>。由于 GP5-M 异源二聚体的形成是病毒感染必需的, 限制了通过反向遗传操作和感染性克隆来研究 GP5 和 M 蛋白的相互作用<sup>[8]</sup>。本研究尝试在体外通过 DNA 表达系统分析 GP5 和 M 蛋白能否形成异源二聚体, 并进一步分析了异源二聚体的形成对 GP5 和 M 蛋白亚细胞定位的影响。为今后深入研究 GP5 和 M 蛋白的相互作用位点、二聚体形成的免疫学意义奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株与细胞:** 含 PRRSV YA1 株 ORF6 基因全长 cDNA 的质粒 pMT-ORF6、编码 GP5 蛋白的真核表达质粒 pCI-ORF5 均由方六荣博士构建并保存<sup>[9]</sup>。pCMVPA 是在 pBluescript SK(+) 载体的基础上经改造插入了 pCI-neo 载体中的 CMV 启动子、多克隆位点 (MCS) 和其中的 BGH polyA, 由本室洪文洲博士提供。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。pCI-neo 真核表达载体购自 Promega 公司。pBSmut4EGFP 含绿色荧光蛋白 mut4EGFP 基因, 由美国斯坦福大学 Okada 博士惠赠。pDsRed2 含红色荧光蛋白

基金项目: 国家自然科学基金 (30300257, 30571385), 国家 973 项目 (2005CB523200)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-27-87282608, E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 马 艳 (1980-), 女, 安徽淮北人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学与基因工程疫苗研究。

收稿日期: 2005-09-21, 接受日期: 2006-03-07, 修回日期: 2006-03-15

DsRed 2 基因,购自 Clontech 公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  由本室保存。BHK-21 细胞购自中国典型培养物中心。

**1.1.2 试剂和仪器** 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司。DNA 快速回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。HRP 标记的羊抗猪 IgG 为 SBA 公司产品。lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。针对 HRP 标记二抗的化学发光底物 (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate) 为 Pierce 公司产品。荧光显微镜为 Olympus IX70 产品。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

本实验设计的引物及其序列见表 1。其中 ,P5F

(含 *Xho* I 酶切位点)与 P5R(含 *Xba* I 酶切位点)可扩增 ORF5 基因的完整编码区(含终止子),大小约为 620bp ;P6F(含 *Eco*R I 酶切位点)和 P6R(含 *Eco*RV 酶切位点)可扩增 ORF6 基因的完整编码区(含终止子),大小约为 530bp ;P5F 与 P5nE(含 *Xba* I 酶切位点)可扩增消去终止子的 ORF5 基因 ;P6F 与 P6nE(含 *Spe* I 酶切位点)可扩增消去终止子的 ORF6 基因 ;PGFPF(含 *Spe* I 酶切位点)与 PGFPR(含 *Eco*RV 酶切位点)可扩增 mut4EGFP 基因,大小约 780bp ;PRFPF(含 *Spe* I 酶切位点)和 PRFPR(含 *Eco*RV 酶切位点)可扩增 DsRed2 基因,大小约为 670bp。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 目的基因片段的扩增引物和 PCR 扩增

Table 1 Primers and PCR amplifications of the interesting genes		
Primer	Sequences(5'-3')	PCR amplification
P5F	GAA CTCGAGAGTATGTTGGGGAATGCTTGACC	95℃ 5min 35 cycles(94℃ 1min , 56℃ 1min 72℃ 1min ) ,72℃ 10min
P5R	TTT TCTAGAGAGACCCCATTTGTTGTTCCGC	
P5nE	TTT TCTAGAGAGACGACCCCATTTGTTCCGC	
P6F	TTT GAATTCACAATGGGGTCGTCTCTAG	95℃ 4min 35 cycles( 95℃ 1min 58℃ 1min , 72℃ 1min ) ,72℃ 10min
P6R	TTT GATATCTTATTTGGCATATTTG	
P6nE	AGC ACTAGTTTITGGCATATTTG	
PGFPF	AGG ACTAGTACCATGCTGAGCAAGGGC	95℃ 4min 35 cycles( 94℃ 1min 58℃ 1min , 72℃ 1min ) ,72℃ 10min
PGFPR	GAA GATATCGTCTTACTTGCACAGCT	
PRFPF	TTT ACTAGTAGCATGGCCTCCTCCGAG	95℃ 5min 35 cycles( 94℃ 1min 55℃ 1min , 72℃ 1min ) ,72℃ 10min
PRFPR	GAA GATATCTACAGGAACAGGCTG	

1.3 真核表达重组质粒的构建

以 pMT-ORF6 为模板 ,P6F、P6R 为引物 ,PCR 扩增 ORF6 基因片段 ,克隆至 pMD 18-T 载体中 ,构建 pT-61。pT-61 经 *Eco*R I 和 *Eco*RV 酶切后插入真核表达载体 pCI-neo 和 pCMVPA 载体的 *Eco*R I 与 *Sma* I 位点之间 ,构建 pCI-ORF6 和 pCMV-61。pCMV-61 用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 酶切后 ,将其中的 CMV-ORF6-BGH polyA 表达盒插到 pCI-ORF5 的 *Bam*H I 位点 ,获得 ORF5 和 ORF6 双基因共表达重组质粒 pCI-ORF5/ORF6。以 pCI-ORF5 为模板 ,P5F、P5nE 为引物 ,PCR 扩增不含终止子的 ORF5 基因 ,克隆至 pMD 18-T 载体中 ,构建 pT-5nE。以 pBSmut4EGFP 为模板 ,PGFPF、PGFPR 为引物扩增 mut4EGFP 基因 ,克隆至 pMD 18-T 载体中 ,构建 pT-EGFP。将用 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切 pT-5nE 回收大小约为 620bp 无终止子的 ORF5 基因片段和用 *Spe* I 和 *Eco*RV 酶切 pT-EGFP 回收大小约为 780bp 的 mut4EGFP 基因片段同时插入 pCI-neo 载体的 *Xho* I 和 *Sma* I 位点之间 ,构建 ORF5 和 mut4EGFP 融合表

达真核质粒 pCI-5EGFP。同样 ,以 pMT-ORF6 为模板 ,P6F、P6nE 为引物 ,PCR 扩增不含终止子的 ORF6 基因 ,克隆至 pMD 18-T 载体中 ,构建 pT-6nE。以 pDsRed2 为模板 ,PRFPF、PRFPR 为引物扩增 DsRed2 基因 ,克隆至 pMD 18-T 载体中 ,构建 pT-RFP。将用 *Eco*R I 和 *Spe* I 酶切 pT-6nE 回收大小约为 530bp 的无终止子的 ORF6 基因片段和用 *Spe* I 和 *Eco*RV 酶切 pT-RFP 回收大小约为 670bp 的 DsRed2 基因片段同时插入 pCI-neo 和 pCMVPA 载体的 *Eco*R I 和 *Sma* I 位点之间 ,构建 ORF6 和 DsRed2 融合表达真核质粒 pCI-6RFP 和 pCMV-6RFP。如上所述构建 ORF5/ORF6 双基因共表达质粒 pCI-ORF5/ORF6 的方法构建 ORF5/mut4EGFP 和 ORF6/DsRed2 共表达真核质粒 pCI-5EGFP/6RFP。

1.4 体外转染

采用 lipofetamine™ 2000 脂质体介导法进行。将大量制备并经 PEG8000 纯化的重组表达质粒 2 $\mu$ g 转染已长成 60% ~ 70% 单层的 BHK-21 细胞 ,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48h 后进行 Western blot 检测或

亚细胞定位分析。

1.5 Western blot 检测

转染后 48 ~ 72h ,收集细胞 ,用细胞裂解液 [20mmol/L Tris-HCl ( pH 7.6 ) ,150mmol/L NaCl ,1% Nonidet P-40 ,0.5% sodium deoxycholate ,0.1% sodium dodecyl sulfate( SDS )]进行充分裂解后 ,分别进行含 50mmol/L DTT( DTT + )变性和不含 DTT( DTT - )非变性的 12% SDS-PAGE ,转膜后进行 Western blot。一抗为与空白载体转染细胞碎片 4℃ 作用过夜的 PRRSV 阳性猪血清 ,适当稀释倍数室温作用 1h 后 ,加入 HRP 标记的羊抗猪 IgG ,室温作用 30min 后 ,利用化学发光检测试剂盒检测 ,具体操作按说明书进行。

1.6 亚细胞定位观察

转染后 48h ,PBS 洗涤细胞 3 次 ,直接置于倒置荧光显微镜下分别观察绿色荧光( 激发波长/释放波长 :474/509nm )和红色荧光( 激发波长/释放波长 :558/583nm )在细胞中的定位。

2 结果和分析

2.1 重组表达质粒的构建与鉴定

按 1.3 所述的方法构建 ORF6 单基因表达质粒 pCI-ORF6 ,ORF5 和 ORF6 双基因共表达质粒 pCI-ORF5/ORF6 以及分别与 EGFP 和 DsRed2 融合的表 达质粒 pCI-5EGFP、pCI-6RFP、pCI-5EGFP/6RFP。各种表达质粒采用合适的酶切鉴定证实构建正确( 图 略 )。同时 ,对各种融合表达质粒进行序列分析 ,证实读框正确。所构建的表达质粒的结构示意图见图版 III -A。

2.2 GP5 和 M 蛋白共表达可形成异源二聚体

为了探讨 pCI-ORF5/ORF6 转染细胞表达的 GP5 和 M 蛋白是否形成异源二聚体 ,将 pCI-neo、pCI-ORF5、pCI-ORF6 和 pCI-ORF5/ORF6 分别转染 BHK-21 细胞 ,转染 48h 后收集细胞 ,分别在变性和非变性条件下进行 Western blot 检测。结果发现在变性胶中 pCI-ORF5 能够表达约为 25kDa 的 GP5 蛋白 ,pCI-ORF6 能够表达约为 18kDa 的 M 蛋白 ,pCI-ORF5/ORF6 则能够同时表达约为 25kDa 的 GP5 蛋白和约为 18kDa 的 M 蛋白 ,与以前报道的病毒本身编码 GP5 和 M 蛋白的分子量相当 ,表明几种表达质粒在转染细胞中均可正确表达目的蛋白。而在非变性胶中 pCI-ORF6 存在了大小约为 18kDa 和 35kDa 两条特异性条带 ,pCI-ORF5/ORF6 则除了 18kDa 和 25kDa 的特异性条带外 ,还有约为 35kDa 和 43kDa 的

特异性条带( 图 1 )。根据分子量大小 ,可以推断 43kDa 的蛋白是 GP5 和 M 蛋白形成的异源二聚体 ,而 35kDa 的蛋白是 M-M 同源二聚体。

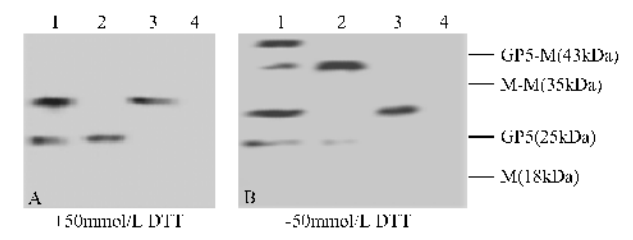


图 1 真核表达质粒转染细胞的 Western blot 分析  
Fig.1 Western blot analysis of the cell lysates transfected with different DNA constructs. A : Reducing condition with 50mmol/L DTT ; B : Nonreducing condition without 50mmol/L DTT. 1. Cell lysates of pCI-ORF5/ORF6 ; 2. Cell lysates of pCI-ORF6 ; 3. Cell lysates of pCI-ORF5 ; 4 : Cells lysates of empty vector pCI-neo.

2.3 GP5 和 M 蛋白共表达改变了 GP5 的亚细胞定位

为了进一步探讨 GP5 和 M 蛋白在细胞内的定位以及 GP5-M 异源二聚体的形成对 GP5 和 M 蛋白定位的影响 ,我们将绿色荧光蛋白 mut4EGFP 基因和红色荧光蛋白 DsRed2 基因分别融合到 ORF5 和 ORF6 基因下游 ,通过两种荧光蛋白的定位模式来间接反映两者蛋白的亚细胞定位。同时 ,与荧光蛋白融合也有利于在活细胞中直接观察 ,更客观地反应蛋白的亚细胞定位。因此 ,将 pCI-5EGFP、pCI-6RFP 和 pCI-5EGFP/6RFP 分别转染 BHK-21 细胞 ,转染后 48h ,在荧光显微镜观察发现 :单独表达 GP5-EGFP 蛋白时 ,绿色荧光主要分布在细胞核周边 ,同内质网定位模式一致<sup>[10,11]</sup> ,而且由于大量表达引起蛋白在内质网内积聚导致细胞的严重肿胀变形( 图版 III -B-a )。而 GP5-EGFP 和 M-DsRed2 共表达时绿色荧光主要分布在细胞核周两极( 图版 III -B-c ) ,同高尔基体定位模式一致<sup>[10,11]</sup>。M 蛋白的亚细胞定位在单独表达和同 GP5 共表达时的定位模式未发生改变( 图版 III -B-b ,d )。

3 讨论

在天然的 PRRSV 病毒粒子表面 GP5 和 M 蛋白可以形成异源二聚体 ,是病毒粒子包装和侵入易感组织和细胞的必要条件<sup>[7,8]</sup>。本研究证实实在非变性条件下 ,由 pCI-ORF5/ORF6 转染细胞内 GP5 和 M 蛋白可以同时共表达 ,并且表达的这两种蛋白可以通过二硫键相连形成异源二聚体 ,这是首次报道证实 在体外转染的细胞内 GP5 和 M 蛋白的相互作用而

形成异源二聚体,表明在没有病毒编码的其它蛋白的参与下,GP5 和 M 蛋白共表达也同样能形成异源二聚体,提示 DNA 表达系统可以作为研究 GP5 和 M 蛋白相互作用的载体系统,这为今后进一步深入研究 GP5 和 M 蛋白的相互作用并确定二者的相互作用位点等提供了理论依据和实验方法。另外,本研究还发现 GP5-M 异源二聚体、M-M 同源二聚体以及 GP5 和 M 蛋白单体同时共存于同一转染细胞内,与 PRRSV 感染细胞蛋白的表达模式与组成是一致的<sup>[7]</sup>。但以前的研究表明通过蔗糖梯度纯化的 PRRSV 病毒粒子只含有 GP5-M 的异源二聚体<sup>[10]</sup>。因此,可以推断 M-M 同源二聚体并不存在于病毒粒子中,其在病毒感染以及病毒粒子形成过程中确切的功能值得深入探讨。

为了探讨 GP5 和 M 蛋白在活细胞内的定位以及 GP5-M 异源二聚体的形成对 GP5 和 M 蛋白定位的影响,本研究采用了 EGFP 和 DsRed2 两种荧光蛋白标记作为示踪。EGFP 和 DsRed2 是两种可以直接在活细胞中观察的标记蛋白并成功应用于多种蛋白的亚细胞定位分析。通过荧光观察,我们发现在 pCI-5EGFP 转染的细胞同 pCI-5EGFP/6RFP 转染细胞内 GP5-EGFP 的分布明显不同。在单独表达 GP5-EGFP 时,其主要分布在内质网并大量积聚导致细胞的严重肿胀变形,而同 M-RFP 共表达时,其主要分布在高尔基体。从内质网向高尔基体转运对于病毒编码的囊膜蛋白获得正确折叠和翻译后的修饰是必需的<sup>[11]</sup>。因此,GP5 和 M 蛋白共表达可能对 GP5 蛋白功能的发挥具有重要意义。事实上,Balasuriya 等<sup>[12]</sup>最近在研究与 PRRSV 同属的马动脉炎病毒(EAV)的甲病毒 RNA 复制子疫苗的过程中发现,当 EAV GP5 和 M 蛋白共表达时,能够形成 GP5-M 异源二聚体,而这种异源二聚体的存在也极大地促进了 GP5 蛋白有效地从内质网向高尔基体的转运,获得正确的翻译后修饰,从而诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生,而单独表达 GP5 的该 RNA 复制子疫苗并不能诱发免疫实验动物特异性中和抗体的产生。

总之,本研究通过 DNA 表达系统在体外获得了 GP5 和 M 蛋白的类天然蛋白表达,并证实了表达的 GP5 和 M 蛋白可以形成异源二聚体,而这种异源二聚体的存在也极大地促进了 GP5 蛋白有效地从内质网向高尔基体的转运。这一研究结果不仅为深入

研究 GP5 和 M 蛋白的相互作用提供良好的工具,而且为发展 PRRSV 新型疫苗提供了新的思路。目前,我们一方面正采用突变分析确定 GP5 和 M 蛋白的相互作用位点;同时,也在尝试利用 GP5 和 M 蛋白共表达形成异源二聚体的特性开展 ORF5 和 ORF6 双基因共表达的 DNA 疫苗研究,以期获得一种具有更好免疫效果的猪繁殖与呼吸综合征的新型疫苗。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 1991, **13**: 121 - 130.
- [ 2 ] Meulenbergh JJ. PRRSV, the Virus. *Vet Res*, 2000, **31**: 11 - 21.
- [ 3 ] 蔡雪晖,柴文君,翁长江,等.猪繁殖与呼吸综合征及其在我国现状与对策.中国预防兽医学报,2000, **22**: 202 - 205.
- [ 4 ] Meulenbergh JJM, Hulst M, De Meijer EJ, *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEDRS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, **192**: 62 - 72.
- [ 5 ] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, *et al.* Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, **145**: 659 - 688.
- [ 6 ] Snijder EJ, Meulenbergh JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 1998, **79**: 961 - 979.
- [ 7 ] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 1996, **221**: 98 - 112.
- [ 8 ] Verheije MH, Welting TJ, Jansen HJ, *et al.* Chimeric arteriviruses generated by swapping the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology*, 2002, **303**: 364 - 373.
- [ 9 ] Fang LR, Jiang YB, Xiao SB, *et al.* Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes*, 2006, **32**: 5 - 11.
- [ 10 ] Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, *et al.* Adenoviral-expressed GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol*, 2003, **148**: 951 - 972.
- [ 11 ] Balasuriya BR, Heidner HW, Davis NL, *et al.* Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine*, 2002, **20**: 1609 - 1617.
- [ 12 ] Rose JK, Doms RW. Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, 1988, **4**: 257 - 288.

## Co-expressed GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus can form heterodimers

MA Yan<sup>1</sup>, JIANG Yun-bo<sup>1</sup>, XIAO Shao-bo<sup>1</sup>, FANG Liu-rong<sup>1,2\*</sup>, CHEN Huan-chun<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine,

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** :In order to investigate the characterization of in vitro co-expressed GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ( PRRSV ), eukaryotic expression plasmids pCI-ORF5 ( expressing GP5 protein alone ), pCI-ORF6 ( expressing M protein alone ), and pCI-ORF5/ORF6 ( co-expressing GP5 and M proteins ) were constructed. After transient transfection, Western blot analysis under nonreducing condition demonstrated that co-expressed GP5 and M proteins could form disulfide-linked heterodimers( GP5-M ) in transiently transfected BHK-21 cells. To further study the influence of GP5-M heterodimers formation on the subcellular localizations of GP5 or M proteins, green fluorescence protein ( EGFP ) and red fluorescence protein ( RFP ) were used as markers. The results of fluorescence distribution showed that co-expressed GP5-EGFP chimera and M-RFP chimera boosted the transport of GP5 from the endoplasmic reticulum ( ER ) to the Golgi complex, indicating that the formation of GP5-M heterodimers may be involved in posttranslational modification, transport, and subcellular localization of GP5. These results presented here lay foundation to further study the molecular mechanism of GP5-M heterodimer formation and its role in protective immunity of PRRSV.

**Keywords** : PRRSV ;ORF5 ;ORF6 ;Co-expression ;Heterodimer

Foundation item : National Natural Sciences Fund of China ( 30300257, 30571385 ); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( 2005CB523200 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-27-87282608 ;E-mail : fanglr@mail.hzau.edu.cn

Received 21 September 2005/Accepted 7 March 2006/Revised 15 March 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>